



Analyse du Glyphosate, Glufosinate et AMPA par LC/MS/MS

Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air

ANALYSE DU GLYPHOSATE, GLUFOSINATE ET AMPA PAR LC/MS/MS

Claudine CHATELLIER / Ahmad EL MASRI (Ineris)

Septembre 2019

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Claudine CHATELLIER/ Ahmad EL MASRI	Fabrice MARLIERE	Marc DURIF
Qualité	Technicienne/Ingénieur « Méthodes et développements en ANALyses pour l'Environnement » Direction des Risques Chroniques	Ingénieur de l'Unité « Accompagnement à la SURveillance de l'air et de l'eau de surface » Direction des Risques Chroniques	Responsable du Pôle Caractérisation de l'Environnement Direction des Risques Chroniques
Visa	 		



LE LABORATOIRE CENTRAL DE SURVEILLANCE DE LA QUALITÉ DE L'AIR

Le Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air est constitué des laboratoires de l'IMT Lille Douai, de l'INERIS et du LNE. Il mène depuis 1991 des études et des recherches à la demande du Ministère chargé de l'environnement, et en concertation avec les Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQA). Ces travaux en matière de pollution atmosphérique ont été financés par la Direction Générale de l'Énergie et du Climat (bureau de la qualité de l'air) du Ministère chargé de l'Environnement. Ils sont réalisés avec le souci constant d'améliorer le dispositif de surveillance de la qualité de l'air en France en apportant un appui scientifique et technique au ministère et aux AASQA.

L'objectif principal du LCSQA est de participer à l'amélioration de la qualité des mesures effectuées dans l'air ambiant, depuis le prélèvement des échantillons jusqu'au traitement des données issues des mesures. Cette action est menée dans le cadre des réglementations nationales et européennes mais aussi dans un cadre plus prospectif destiné à fournir aux AASQA de nouveaux outils permettant d'anticiper les évolutions futures.

TABLE DES MATIERES

RESUME	7
ABSTRACT	9
1. CONTEXTE ET OBJECTIFS	10
2. METHODE D'ANALYSE.....	11
2.1 Analyse par LC/MS/MS.....	11
2.1.1 Conditions chromatographiques.....	12
2.1.2 Conditions spectrales	13
2.1.3 Profil chromatographique	14
2.1.4 Détermination des fonctions d'étalonnage en étalonnage externe.....	14
2.2 Dérivation au FMOC-Cl selon la norme NF-ISO 16308 (paragraphe 8.2.2 de la norme).....	16
2.2.1 Dérivation	16
2.2.2 Rendement de la réaction de dérivation	17
2.3 Rendement d'extraction des filtres.	19
3. STABILITE.....	20
3.1 Stabilité des prélèvements sur filtre Quartz	20
3.2 Stabilité des extraits dérivés	22
4. ANALYSE D'ECHANTILLONS FOURNIS PAR LE LABORATOIRE IANESCO.....	23
5. CONCLUSION	25
6. GLOSSAIRE.....	26

RESUME

Le glyphosate et ses métabolites (acide aminométhylphosphonique – AMPA – et glufosinate) font partie de la liste des substances cibles de la campagne nationale exploratoire sur les pesticides (CNEP) réalisée par l'Anses, le réseau des AASQA et l'Ineris en tant que membre du LCSQA, entre juin 2018 et juin 2019.

Le laboratoire prestataire (IANESCO) pour les analyses des échantillons de la CNEP a rapporté des problèmes d'interférence sur la détection du glufosinate par chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence, impliquant de devoir augmenter la limite de quantification de ce composé.

Ainsi, l'objectif de ces travaux était de tester une autre technique d'analyse basée sur la chromatographie liquide avec un couplage à un spectromètre de masse, en se basant sur les travaux du Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques AQUAREF (fiche méthode MA-01 de 2008) et la norme NF ISO 16308.

Les tests effectués sur la méthode développée en LC/MS/MS par le LCSQA-Ineris montrent que l'utilisation de la spectrométrie de masse permet de s'affranchir du problème d'interférence soulevé par le laboratoire IANESCO, et d'atteindre des LQ de 0,2 ng/mL pour le glufosinate et 2 ng/mL pour le glyphosate et l'AMPA.

Les rendements d'extraction incluant l'étape de dérivation au FMOC sont satisfaisants pour l'AMPA et le glufosinate, supérieurs à 80%, tandis que celui du glyphosate est d'environ 60%.

Selon les performances de la méthode d'analyse établies (LQ analytiques obtenues en LC/MS/MS et rendements d'extraction et de dérivation), les limites de quantification pour chacune des 3 substances sont les suivantes :

	LQ LC/MS/MS (ng/mL)	Rendement Extraction + Dérivation	LQ méthode (ng)	DA 80 LQ (ng/m3)	Partisol LQ (ng/m3)
Glyphosate	2	61 %	260	0,4	1,5
AMPA	2	85 %	190	0,3	1,1
Glufosinate	0,2	84 %	19	0,03	0,11
Volume d'air prélevé				720 m ³	168 m ³
Durée du prélèvement				24h ou 48h	1 semaine

Les résultats de l'étude de stabilité sur filtre quartz montrent pour le glyphosate et le glufosinate une légère perte pendant les 15 premiers jours de stockage à 4°C, autour de 15 %, puis une stabilisation jusqu'à la fin de l'étude à J60. Les résultats de l'AMPA montrent que ce composé est stable pendant les 60 jours de stockage à 4°C.

La stabilité de l'AMPA et du glyphosate dans les extraits a été démontrée sur une période de 35 jours.

ABSTRACT

Glyphosate and its metabolites (aminomethylphosphonic acid - AMPA - and glufosinate) are included in the list of targeted substances of the national exploratory campaign on pesticides (CNEP) carried out by Anses, the AASQA network and Ineris as a member of the LCSQA, between June 2018 and June 2019.

The contractor laboratory (IANESCO) for the analysis of CNEP samples reported interference problems with the detection of glufosinate by liquid chromatography coupled with a fluorescence detector, implying the need to increase the quantification limit of this compound.

Thus, the objective of this work was to test another analytical technique based on liquid chromatography coupled to a mass spectrometer, according to the work of the National Reference Laboratory for the monitoring of aquatic environments AQUAREF (MA-01 method sheet of 2008) and the NF ISO 16308 standard.

Tests on the LC/MS/MS method developed by LCSQA-Ineris show that the use of mass spectrometry can overcome the problem of interference raised by the IANESCO laboratory and enable to achieve a LoQ of 0.2 ng/mL for glufosinate and 2 ng/mL for glyphosate and AMPA.

Extraction yields including the FMOC derivatization step are suitable for AMPA and glufosinate, above 80%, while for glyphosate it's around 60%.

Based on the performance of the established analytical method (analytical LoQ obtained in LC/MS/MS and extraction and derivatization yields), the quantification limits for each of the 3 substances are:

	LoQ LC/MS/MS (ng/mL)	Extraction + derivatisation efficiency	LoQ method (ng)	DA 80 LoQ (ng/m ³)	Partisol LoQ (ng/m ³)
Glyphosate	2	61 %	260	0,4	1,5
AMPA	2	85 %	190	0,3	1,1
Glufosinate	0,2	84 %	19	0,03	0,11
Air volume sampled				720 m ³	168 m ³
Sampling time				24h or 48h	1 week

The results of the quartz filter stability study show a slight loss for glyphosate and glufosinate during the first 15 days of storage at 4°C, around 15%, and then values stabilize until the end of the study at J60. The results of the AMPA show that this compound is stable during the 60 days of storage at 4°C.

The stability of AMPA and glyphosate in the extracts was demonstrated over a 35-day period.

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Le glyphosate et ses métabolites (acide aminométhylphosphonique – AMPA – et glufosinate) font partie de la liste des substances cibles de la campagne nationale exploratoire sur les pesticides (CNEP) réalisée par l'Anses, le réseau des AASQA et l'Ineris en tant que membre du LCSQA, entre juin 2018 et juin 2019 ([communiqué de presse du lancement de la campagne](#)).

En 2011, le LCSQA/Ineris avait déjà développé un protocole analytique basé sur une analyse par dérivation post-colonne à l'OPA (orthophtaldéhyde) sur une chaîne HPLC munie d'un Pickering et d'un détecteur fluorimétrique.

Par ailleurs, le laboratoire prestataire (IANESCO) pour les analyses des échantillons de la CNEP a rapporté des problèmes d'interférence sur la détection du glufosinate par chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence, impliquant de devoir augmenter la limite de quantification de ce composé dans les extraits des supports de prélèvements.

Ainsi, l'objectif de ces travaux étaient de tester une autre technique d'analyse plus spécifique basée sur la chromatographie liquide avec un couplage à un spectromètre de masse, en se basant sur les travaux du Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques (AQUAREF)¹ et la norme NF ISO 16308.

La première partie de cette étude a porté sur le développement de la méthode d'analyse et la détermination du rendement de la réaction de dérivation, du rendement d'extraction et de la stabilité des extraits dérivés. La deuxième partie a consisté à analyser des extraits d'échantillons de la CNEP, envoyés par le laboratoire IANESCO, afin de valider sur des échantillons réels la méthode développée.

¹ Fiche méthode MA-01 de 2008. https://www.aquaref.fr/system/files/Aquaref_2013_D1b_Irstea_MA01-Glyphosate_Ampa_eaux_VFdoc.pdf

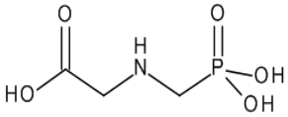
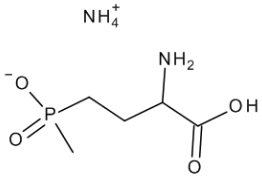
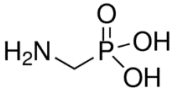
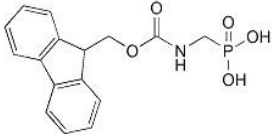
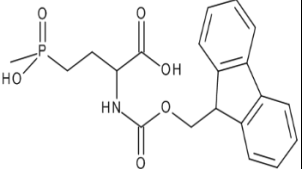
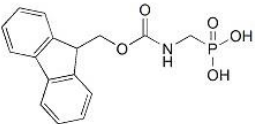
2. METHODE D'ANALYSE

Le glyphosate et ses dérivés peuvent être analysés en direct ou après dérivation.

Lors de cette étude, toutes les analyses ont été réalisées après dérivation au FMOC-Cl ((9-fluorénylméthyl)-chloroformate). Cette réaction permet de diminuer la polarité de ces molécules et de faciliter la rétention de ces composés sur les colonnes de chromatographie liquide en phase inverse.

Le tableau ci-dessous montre les différentes structures des molécules avec et sans dérivation, ainsi que les masses molaires correspondantes.

Tableau 1 : Structures des 3 composés ciblés et de leur dérivé-FMOC.

	Glyphosate	Glufosinate	AMPA
Masse molaire (g/mol)	169	198	111
Structure			
Masse molaire du dérivé-FMOC (g/mol)	391	403	333
Structure du dérivé-FMOC			

2.1 Analyse par LC/MS/MS

L'analyse est réalisée en LC/MS/MS sur un couplage WATERS, UPLC® Acquity et TQD Acquity. La colonne de chromatographie liquide est une colonne X-Bridge C18 -2,5 µm (50 x 2,1 mm) -WATERS.

2.1.1 Conditions chromatographiques

Les conditions de gradient chromatographique suivies et issues de la norme NF ISO 16308 sont décrites dans le tableau ci-après :

Tableau 2 : Conditions de gradient de la phase mobile en LC.

Temps (min)	Acétonitrile (%)	EMQ 0,1 % TEA pH = 9,5 (*) (%)	Débit (mL/min)	Température de colonne (°C)
0	8	92	0,4	40
1,5	8	92		
3,0	95	5		
4,5	95	5		
6,0	8	92		
11,0	8	92		

(*) EMQ 0,1% TEA pH=9,5 : 1 L d'eau ultrapure, filtrée à 0,2 µm provenant du système MilliQ de Millipore® + 1 mL de triéthylamine. Le pH est ajusté au pH mètre à 9,5 ± 0,5 avec de l'acide acétique glacial.

Le pH de la phase mobile doit être alcalin (pH 9 à 9,5) de façon à obtenir les meilleures performances chromatographiques (symétrie des pics et pics étroits). La phase mobile tampon n'est pas stable, au bout de 4 jours le pH est de 8,8 et au bout d'une semaine le pH est de 7.

Par ailleurs, une attention particulière est apportée dans la fiche méthode AQUAREF MA-01 (document qui a été porté en normalisation pour la rédaction de la norme NF ISO 16 308) concernant la colonne de chromatographie : un relargage par la colonne peut parfois se produire ; il est recommandé dans ce cas d'injecter un blanc entre chaque échantillon. Par ailleurs, à la fin des analyses, il est recommandé de rincer plusieurs fois la colonne, par exemple 25 min à 0,4 mL/min avec un mélange EMQ/ Acétonitrile (65 : 35) afin d'éliminer l'acétate de triéthylammonium et les traces d'analytes. Il faut alors reconditionner la colonne avec les éluants et selon les proportions initiales du gradient lors d'une utilisation ultérieure. Par expérience, il faut injecter au moins 5 blancs d'EMQ pour équilibrer la colonne.

Le volume d'injection est de 50µL. Le passeur d'échantillon est réfrigéré à 8°C, le solvant du corps de piston de l'injecteur (« Purge solvent ») est composé d'un mélange EMQ/ Acétonitrile (90:10), proche des conditions initiales de chromatographie. Le solvant de rinçage de l'aiguille de l'injecteur (« Wash solvent ») est un mélange EMQ/Acétonitrile (50:50).

2.1.2 Conditions spectrales

Les conditions spectrales des composés dérivés ont été déterminées par infusion combinée de la solution étalon préparée dans l'eau et de la phase mobile Acétonitrile - EMQ 0,1 % Triéthylamine pH = 9,5 (50 :50) sur l'analyseur TQD WATERS Acquity :

- Température de source (°C) : 150
- Température de désolvatation (°C) : 400
- Débit de gaz du cône (L/h) : 50
- Débit de gaz désolvatation (L/h) : 800
- Débit de gaz de collision (mL/min) : 0,17
- Mode d'ionisation : Electrospray en mode négatif (ESI-Neg)
- Tension de Capillaire (kV) : 3,0
- Tension de l'extracteur (V) : 1,0
- RF (V) : 0,3
- Mode d'acquisition : MRM (Mode de Réactions Multiples)

Les conditions spectrométriques mises en œuvre (transitions MRM, dwell time, tension de cône et énergie de collision) pour chaque composé dérivé sont décrites dans le tableau 3.

Tableau 3 : Conditions spectrométriques en ESI-neg pour le glyphosate, glufosinate et AMPA dérivés au FMOC

Composé dérivé	Transition MRM (m/z)	Dwell time (s)	Tension de Cône (V)	Energie Collision (eV)
Glyphosate-FMOC	390,2 > 168,1 ^(a)	0,05	18	11
	390,2 > 150 ^(b)	0,05	18	22
AMPA-FMOC	332,2 > 110 ^(a)	0,05	14	6
	332,2 > 136 ^(b)	0,05	14	15
Glufosinate-FMOC	402,2 > 180,2 ^(a)	0,05	22	10
	402,2 > 206,2 ^(b)	0,05	22	15

^(a) Transition de quantification ^(b) Transition de qualification

2.1.3 Profil chromatographique

Le profil chromatographique obtenu est présenté ci-dessous. On obtient le même temps de rétention de 3,15 minutes pour le glufosinate-FMOC et l'AMPA-FMOC mais leurs fenêtres de transition MRM permettent de les différencier.

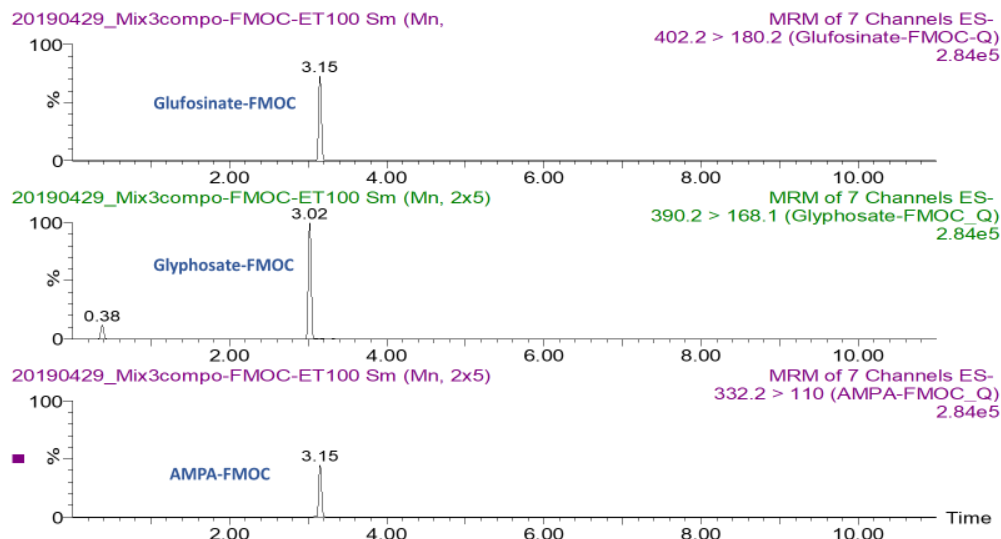


Figure 1 : Etalon équivalent à 100 ng/mL de glyphosate-FMOC, de glufosinate-FMOC et d'AMPA-FMOC (concentration en non dérivé).

2.1.4 Détermination des fonctions d'étalonnage en étalonnage externe

Les modèles des fonctions d'étalonnage sont quadratiques de second degré sur l'ensemble du domaine de concentrations étudié (de 0,2 à 200 ng/mL). La limite de quantification (LQ) testée de 0,2 ng/mL est atteignable pour chacun des composés dans les conditions optimales de la colonne chromatographique. Cependant, cette LQ ne peut être tenue que si des conditions drastiques sont mises en œuvre pour s'assurer que la valeur de blanc de relargage de la colonne est inférieure à LQ/3.

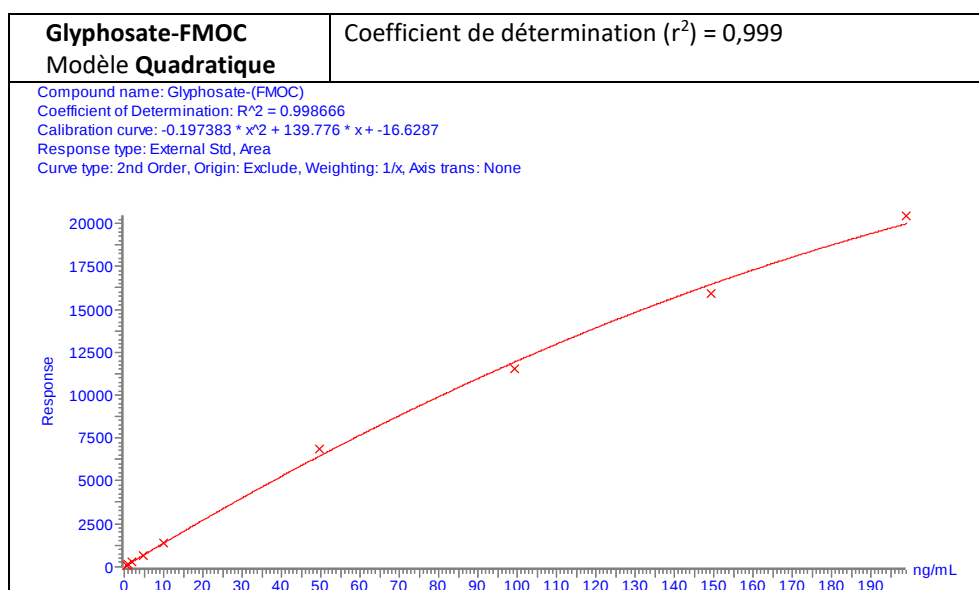


Figure 2 : Fonction d'étalonnage du glyphosate-FMOC sur la colonne X-Bridge C18 de 0,2 ng/mL à 200 ng/mL en équivalent Glyphosate.

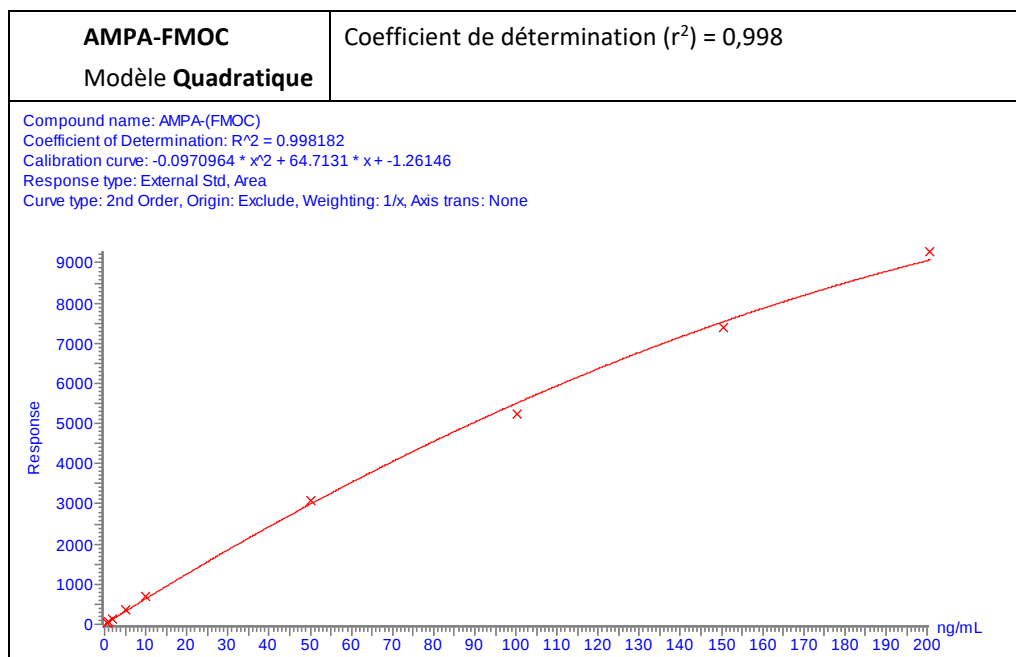


Figure 3 : Fonction d'étalonnage de l'AMPA-FMOC sur la colonne X-Bridge C18 de 0,2 ng/mL à 200 ng/mL en équivalent AMPA.

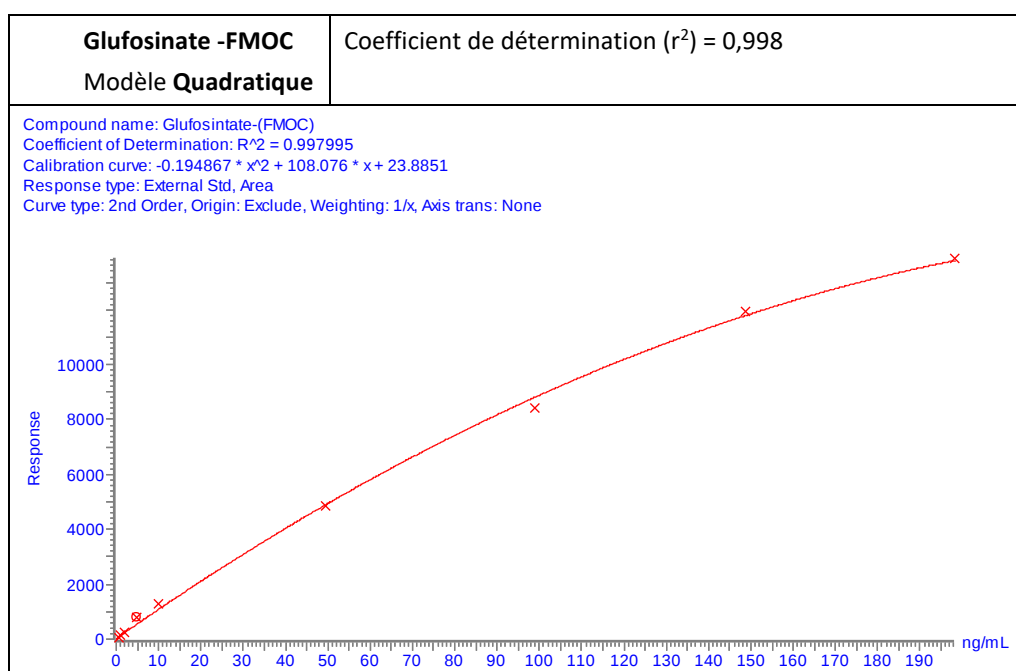


Figure 4 : Fonction d'étalonnage du glufosinate-FMOC sur la colonne X-Bridge C18 de 0,2 ng/mL à 200 ng/mL en équivalent glufosinate.

Les LQ et les fonctions d'étalonnage observées sont satisfaisantes ; il faut cependant s'assurer du rendement de dérivation et définir une LQ pour laquelle la valeur de blanc est inférieure à $LQ/3$ (cf 8.6 de la norme ISO 16308).

En pratique, lors des séquences d'analyse, des effets de relargage de colonne sont observés. Les valeurs de blancs d'injection d'EMQ obtenues entre 2 analyses d'échantillon sont de l'ordre de 0,6 ng/mL pour l'AMPA et de 0,5 ng/mL pour le glyphosate. Ces teneurs sont dues au relargage de la colonne comme l'annonçait la fiche méthode AQUAREF MA-01. Le relargage du glufosinate est détectable mais reste inférieur à la LQ de 0,2 ng/mL fixée.

Compte tenu de valeurs de blanc analytique pour l'AMPA et le glyphosate, la LQ analytique de ces deux composés est augmentée à 2 ng/mL.

2.2 Dérivation au FMOC-Cl selon la norme NF-ISO 16308 (paragraphe 8.2.2 de la norme)

2.2.1 Dérivation

La méthode suivie dans les laboratoires de l'Ineris est la suivante :

- Tarer un erlenmeyer de 25 mL (équipé d'un bouchon en verre) ⁽²⁾ contenant un barreau aimanté ;
- Ajouter 5 mL d'échantillon d'eau (ou d'extrait aqueux obtenu après extraction du filtre Quartz) ;
- Ajouter 100 µL d'une solution d'EDTA disodique (à 0,1 mol/L dans EMQ) ⁽³⁾ ;
- Agiter 1 min et laisser reposer 10 min (erlenmeyer fermé) ;
- Ajouter 2 mL de tampon Borate (à 0,05 mol/L) ⁽⁴⁾ ;
- Agiter à 400 rpm (dans la pratique : 270 rpm est déjà une agitation soutenue et au-dessus le barreau n'est plus stable et sort de l'agitation) pendant 30 min afin d'ajuster le pH entre 9 et 9,5 (erlenmeyer fermé) ;
- Ajouter 400 µL de FMOC-Cl ⁽⁵⁾ ;
- Agiter 4 h à 400 rpm (dans la pratique : 270 rpm), erlenmeyer fermé ;
- Attendre 12 h, dans la pratique 16 h, correspondant à une nuit ;
- Neutraliser avec HCl 37% (~15 à 20 µL) ;
- Déterminer le volume final exacte en pesant l'erlenmeyer (volume final ~8 mL) ;
- Filtrer une aliquote sur filtre seringue 0,45 µm de cellulose (25 mm de diamètre) ;
- Analyser l'extrait.

² L'étape de dérivation doit être réalisée dans des récipients en verre, pas de plastique.

³ Peser 744 mg d'EDTA, sel disodique dihydraté, (CAS 6381-92-6) qsp 20 mL d'EMQ afin d'obtenir une solution à 0,1 mol/L, agiter et laisser reposer 10 min en fiole fermée.

⁴ 3,8 g ± 0,1 g de tétraborate de sodium décahydraté dans 200 mL d'EMQ, solution à conserver à +4°C ± 3°C pendant 1 mois.

⁵ : solution de FMOC-Cl (9-fluorénylméthyl) chloroformate) à 500 µg/mL dans ACN, solution à conserver à -18°C pendant 6 mois.

2.2.2 Rendement de la réaction de dérivation

Une série de 5 essais concernant uniquement le glyphosate et l'AMPA a été mise en œuvre dans un premier temps :

- 2 Blancs (5 mL d'EMQ) ;
- 3 Dopages (5 mL d'EMQ enrichi avec 484 ng de glyphosate et 489 ng d'AMPA).

Une deuxième série de 5 essais, est réalisée deux mois après, à la réception du glufosinate-FMOC commercial :

- 2 Blancs (5 mL d'EMQ) ;
- 3 Dopages (5 mL d'EMQ enrichi avec 484 ng de glyphosate, 489 ng d'AMPA et 477 ng de glufosinate).

Aucun étalon interne n'a été ajouté lors de la dérivation.

Les rendements de la réaction de dérivation sont déterminés à partir d'un étalonnage réalisé avec le glyphosate-FMOC, l'AMPA-FMOC et le glufosinate-FMOC commerciaux.

Le volume final de chaque essai a été déterminé par pesée, il est en moyenne de 7,5 mL.

Tableau 4 : Rendements de dérivation au FMOC-Cl du glyphosate, de l'AMPA et du glufosinate.

		Glyphosate		AMPA		Glufosinate	
		Rendement non corrige EI (%)	Rendement moyen (%) Non corrige EI	Rendement non corrige EI (%)	Rendement moyen (%) Non corrige EI	Rendement non corrige EI (%)	Rendement moyen (%) Non corrige EI
Série 1	Essai 1	41%	49 % (± 7 %)	66 %	75 % (± 6 %)		
	Essai 2	58 %		80 %			
	Essai 3	49 %		79 %			
Série 2	Essai 1	53 %	50 % (± 5 %)	78 %	75 % (± 2 %)	88 %	82 % (± 6 %)
	Essai 2	54 %		76 %		85 %	
	Essai 3	43%		73 %		74 %	

La valeur moyenne des blancs d'essais (essais non dopés) est inférieure à 0,2 ng/mL pour le glyphosate, le glufosinate et l'AMPA.

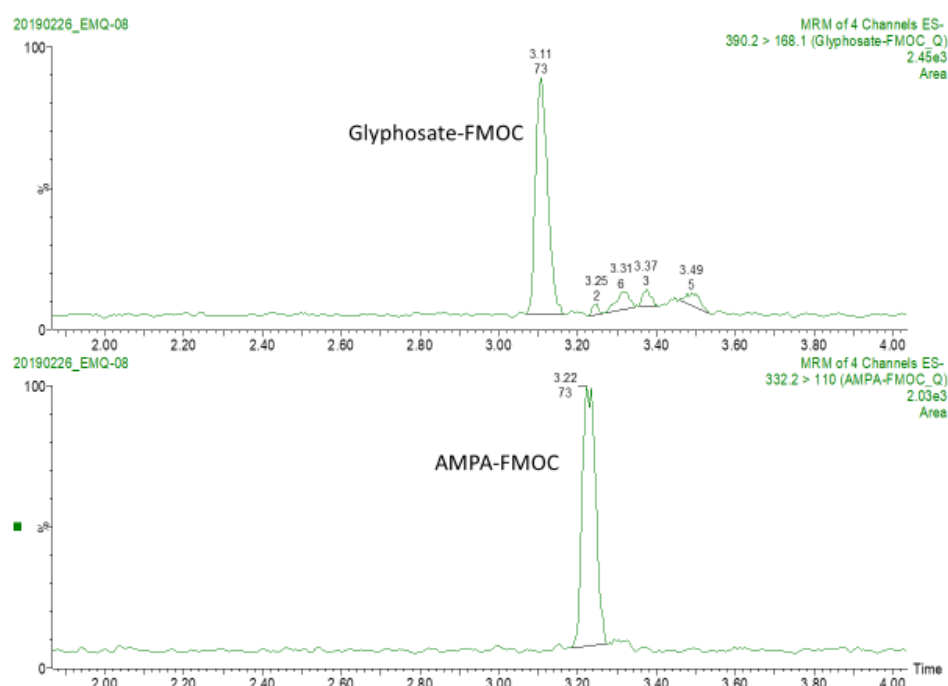


Figure 5 : Chromatogramme d’une injection d’EMQ après l’analyse d’un essai enrichi à 484 ng de glyphosate et 489 ng d’AMPA.

Les rendements de dérivation sont acceptables pour l’AMPA (75%) et le glufosinate (82%).

En revanche, les rendements de dérivation obtenus pour le glyphosate, bien que répétables, sont faibles (~ 50%). Un étalonnage externe à partir d’une gamme étalon extraite et dérivée ou l’utilisation d’un étalonnage interne (ajout de glyphosate marqué) permet de contourner ce problème de rendement de dérivation faible.

On remarque que les profils chromatographiques des essais dérivés sont identiques à ceux obtenus sur des étalons commerciaux, comme le montre la figure ci-après.

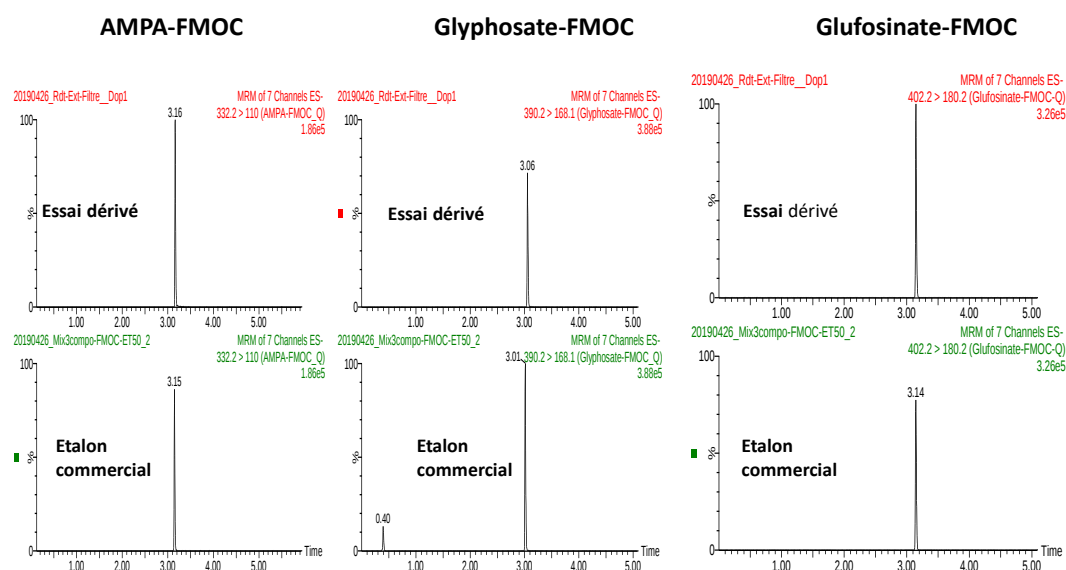


Figure 6 : Chromatogrammes de l’AMPA-FMOC, du glyphosate-FMOC et du glufosinate-FMOC commerciaux et dérivés.

2.3 Rendement d'extraction des filtres.

Les essais d'extraction ont été réalisés sur des filtres en Quartz (diamètre de 150 mm), préalablement conditionnés par calcination. Ces essais ont pour objet de déterminer pour chaque substance le rendement global d'extraction et de dérivation sur des filtres en quartz.

Le dopage est réalisé sur 3 filtres, chaque filtre est dopé avec 5000 ng de chacun des composés (correspondant à une teneur de ~7 ng/m³ pour 720 m³ prélevé sur DA 80 ou ~30 ng/m³ pour 168 m³ prélevé sur un Partisol). Un filtre non dopé est traité en tant que blanc d'extraction.

L'extraction est réalisée par 50 mL d'EMQ aux ultra-sons pendant 15 min (détermination du volume final par double pesée).

Une aliquote de 5 mL de l'extrait est prélevée et dérivée selon le protocole défini en 2.2.1., le volume de l'extrait final est déterminé par double pesée (~8 mL).

La valeur cible de l'extrait final dopé est de 62 ng/mL.

Deux séries d'essai ont été réalisées du fait du délai de réception de glufosinate-FMOC commercial.

Les rendements d'extraction des filtres quartz, avec l'étape de dérivation, sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Rendements d'extraction du glyphosate, de l'AMPA et du glufosinate avec l'étape de dérivation.

		Glyphosate		AMPA		Glufosinate	
		Rendement non corrige EI (%)	Rendement moyen (%) Non corrige EI	Rendement non corrige EI (%)	Rendement moyen (%) Non corrige EI	Rendement non corrige EI (%)	Rendement moyen (%) Non corrige EI
Série 1	Essai 1	55 %	63 % (± 8 %)	80%	88 % (± 11 %)	/	/
	Essai 2	74 %		104%		/	
	Essai 3	61 %		81%		/	
Série 2	Essai 1	50%	59 % (± 6 %)	74%	82 % (± 8 %)	76%	84 % (± 8 %)
	Essai 2	66%		92%		95%	
	Essai 3	60%		81%		82%	
Rendement moyen sur 2 séries (%)			61 % (± 8 %)		85 % (± 10 %)		

Les rendements d'extraction avec l'étape de dérivation au FMOC sont satisfaisants pour l'AMPA et le glufosinate, supérieurs à 80%, tandis que celui du glyphosate n'est que de 61%. L'extraction est efficace pour les trois composés car ces rendements correspondent aux rendements de dérivation obtenus au 2.2.2.

3. STABILITE

3.1 Stabilité des prélèvements sur filtre Quartz

La stabilité du prélèvement a été réalisée sur 60 jours aux dates suivantes : J0, J15, J30 et J60, selon un schéma pseudo-isochrone de type 1. Pour ce faire, à chacune de ces dates, trois filtres ont été dopés par 100 µL (10 fois 10µL) d'une solution à 100 ng/µL afin d'obtenir des teneurs de chaque pesticide à 10 µg/support (200 ng/mL dans l'extrait aqueux).

Chaque filtre est stocké individuellement dans un emballage en aluminium calciné et dans une pochette plastique, puis stocké à +4°C.

A J0, une dernière série de dopage de 3 filtres est réalisée et l'ensemble des supports, soit 12 supports au total, est extrait selon la méthode d'extraction décrite en 2.3.

Les résultats de stabilité du prélèvement sur filtre Quartz sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : Résultats d'analyse des essais de stabilité du glyphosate, glufosinate et AMPA sur prélèvements filtres conservés à 4°C sur 60 jours

	Glyphosate			Glufosinate			AMPA		
Date	Conc. Moyenne (n=3) (ng/mL)	Ecart type relatif (%) (n=3)	Ecart à la valeur cible	Conc. Moyenne (n=3) (ng/mL)	Ecart type relatif (%) (n=3)	Ecart à la valeur cible	Conc. Moyenne (n=3) (ng/mL)	Ecart type relatif (%) (n=3)	Ecart à la valeur cible
J0	202.1	4%	4%	220.2	2%	15%	179.9	0%	-8%
J15	174.0	8%	-10%	193.7	3%	1%	181.6	2%	-7%
J30	168.9	5%	-13%	175.5	0%	-8%	180.0	1%	-8%
J60	167.5	19%	-13%	181.6	6%	-5%	191.2	6%	-2%
Valeur cible (ng/mL)	193.6			191.0			195.8		

Les résultats de l'étude de stabilité du glyphosate montrent une légère perte pendant les 15 premiers jours de stockage à 4°C, autour de 15%, puis une stabilisation jusqu'à J60, date de fin de l'étude, comme l'illustre la figure ci-dessous :

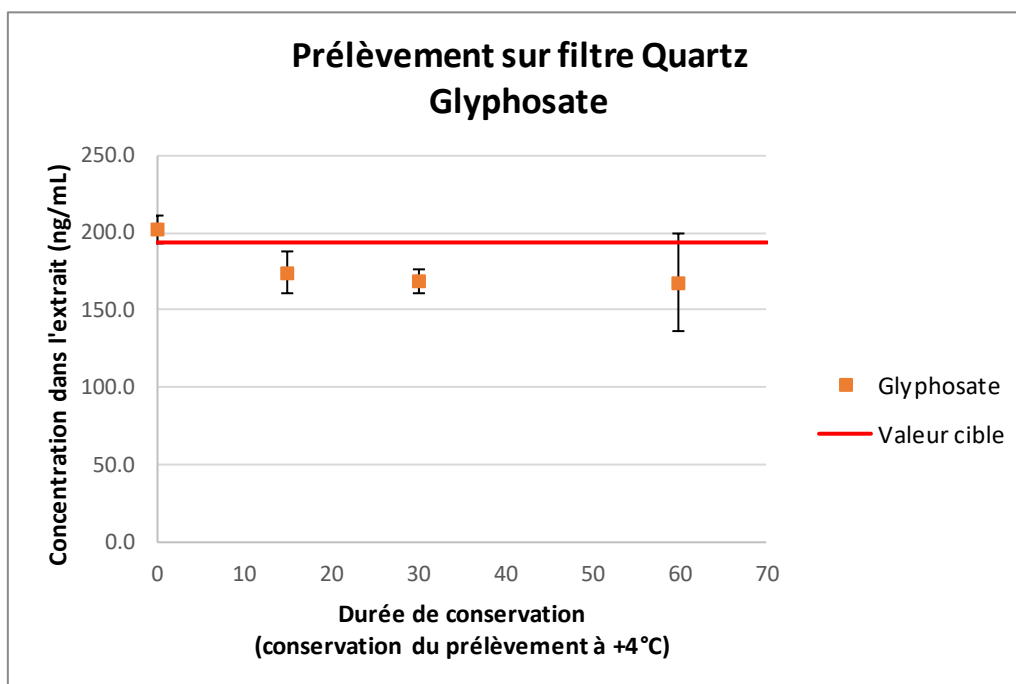


Figure 7 : Stabilité du glyphosate sur prélèvement filtre sur 60 jours à 4°C.

Les résultats de l'étude de stabilité du glufosinate montrent une légère perte pendant les 15 premiers jours de stockage à 4°C, autour de 15%, puis une stabilisation jusqu'à J60, date de fin de l'étude, comme l'illustre la figure ci-dessous :

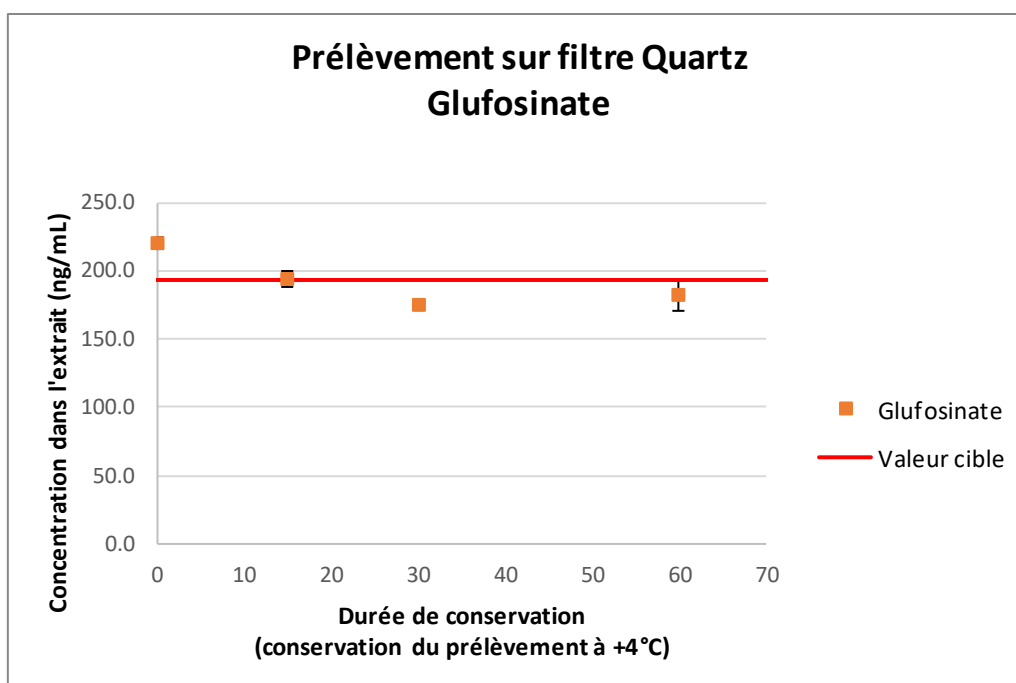


Figure 8 : Stabilité du glufosinate sur prélèvement filtre sur 60 jours à 4°C.

Les résultats de l'AMPA montrent que ce composé est stable pendant les 60 jours de stockage à +4°C, comme l'illustre la figure ci-dessous :

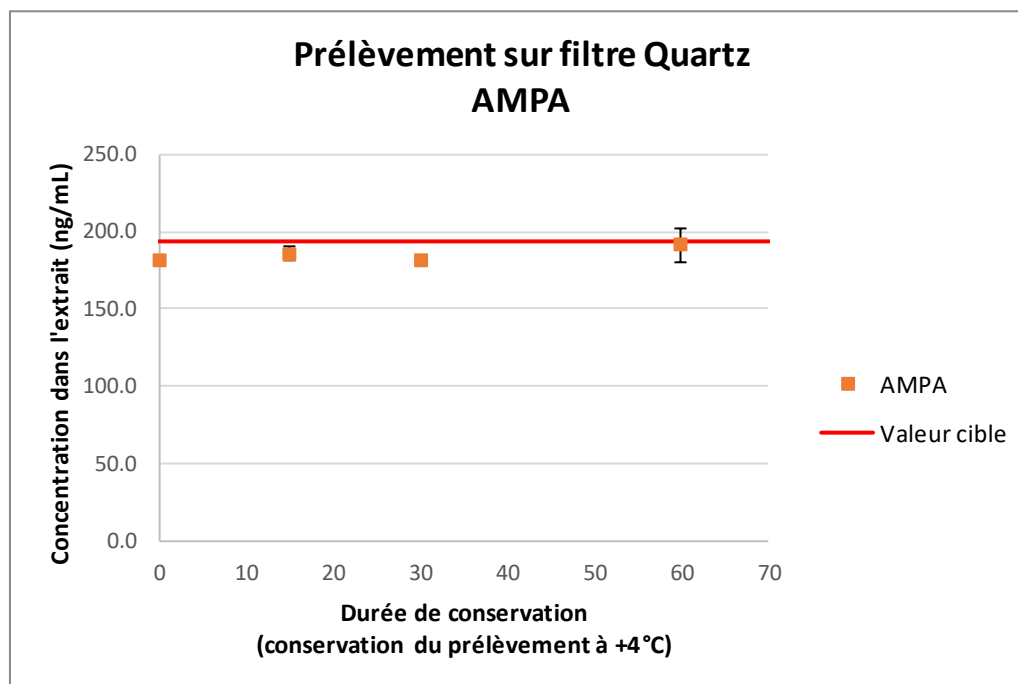


Figure 9 : Stabilité de l'AMPA sur prélèvement filtre sur 60 jours à 4°C

3.2 Stabilité des extraits dérivés

La stabilité a été réalisée sur 35 jours, sur les extraits dérivés de la série 1 en 2.2.2. Le glufosinate ne fait donc pas partie de l'étude, le glufosinate-FMOC n'étant pas disponible au laboratoire à la date de l'étude des rendements de dérivation. Pour rappel, il s'agissait de définir le rendement de dérivation du glyphosate et de l'AMPA en dopant 5 mL d'eau ultrapure (milieu d'extraction) par 50 µL d'une solution à 10 ng/µL, soit une teneur de 100 ng/mL en chacun des composés puis de réaliser la dérivation.

Les extraits dérivés (n=3) ont été analysés à J0 puis stockés à +4°C et analysés à J3, J6, J16 et J35. Les résultats de stabilité des extraits sont présentés ci-dessous.

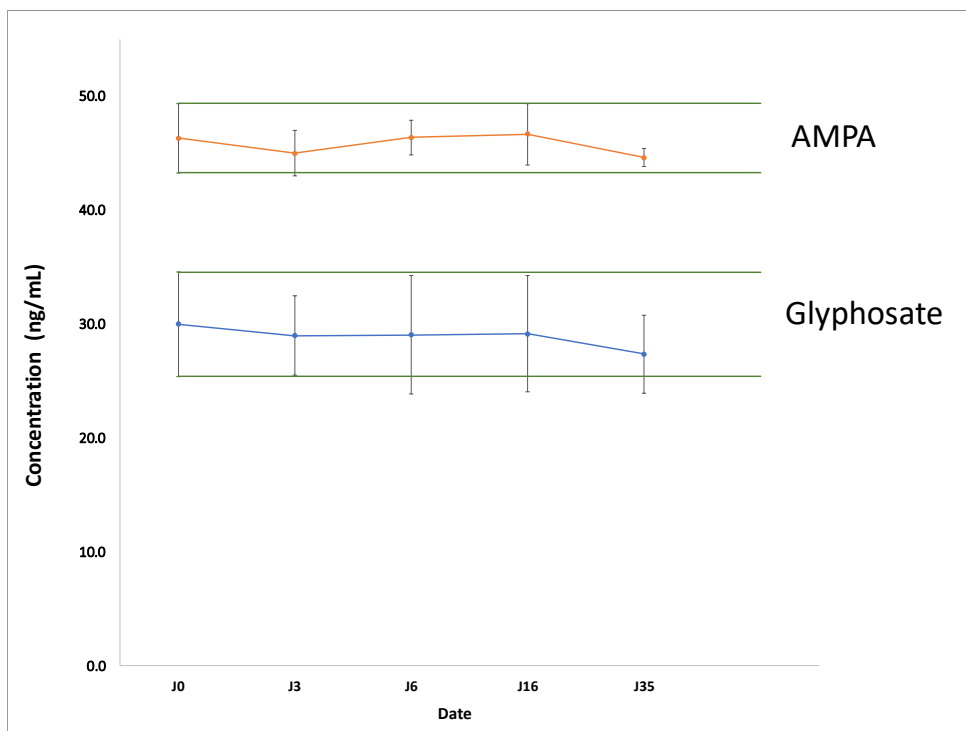


Figure 10 : Stabilité du glyphosate et de l'AMPA dans des extraits dérivés stockés à 4°C.

Le glyphosate et l'AMPA dérivés au FMOC sont stables pendant 35 jours dans la limite de l'écart type de répétabilité de mesure observée à J0 pour chacun des composés.

4. ANALYSE D'ÉCHANTILLONS FOURNIS PAR LE LABORATOIRE IANESCO

Afin de valider sur des échantillons réels la méthode d'analyse développée, l'Ineris a reçu des extraits dérivés de la part du laboratoire IANESCO, parmi lesquels un échantillon de la CNEP :

- Un étalon à 0,5 ng/mL dérivé au FMOC-Cl, appelé « Etalon » dans ce rapport.
- Un étalon à 0 ng/mL dérivé au FMOC-Cl (blanc étalonnage), appelé « Blanc » dans ce rapport.
- Un échantillon dérivé au FMOC-Cl avec des traces de glyphosate et des interférences sur le glufosinate, appelé « Échantillon » dans ce rapport.

L'ensemble de ces échantillons étaient issus de la CNEP (donc déjà analysés par la méthode utilisée par le laboratoire IANESCO (LC/Fluo)).

Selon la méthode suivie par le laboratoire IANESCO (MA-MPO-606), les extraits dérivés fournis par IANESCO sont à pH acide. Afin de les analyser selon la méthode de l'Ineris, le pH a été neutralisé à l'aide d'une solution de NaOH 2N.

Les extraits dérivés fournis par IANESO, une fois neutralisés, ont été analysés selon les conditions de la méthode Ineris par LC/MS-MS. Les profils chromatographiques obtenus selon la méthode LC/MS/MS Ineris ont été comparés au profil obtenu selon la méthode LC/Fluo du laboratoire IANESCO. Les chromatogrammes obtenus en LC/MS/MS et en LC/Fluo pour ces 3 extraits sont comparés ci-dessous :

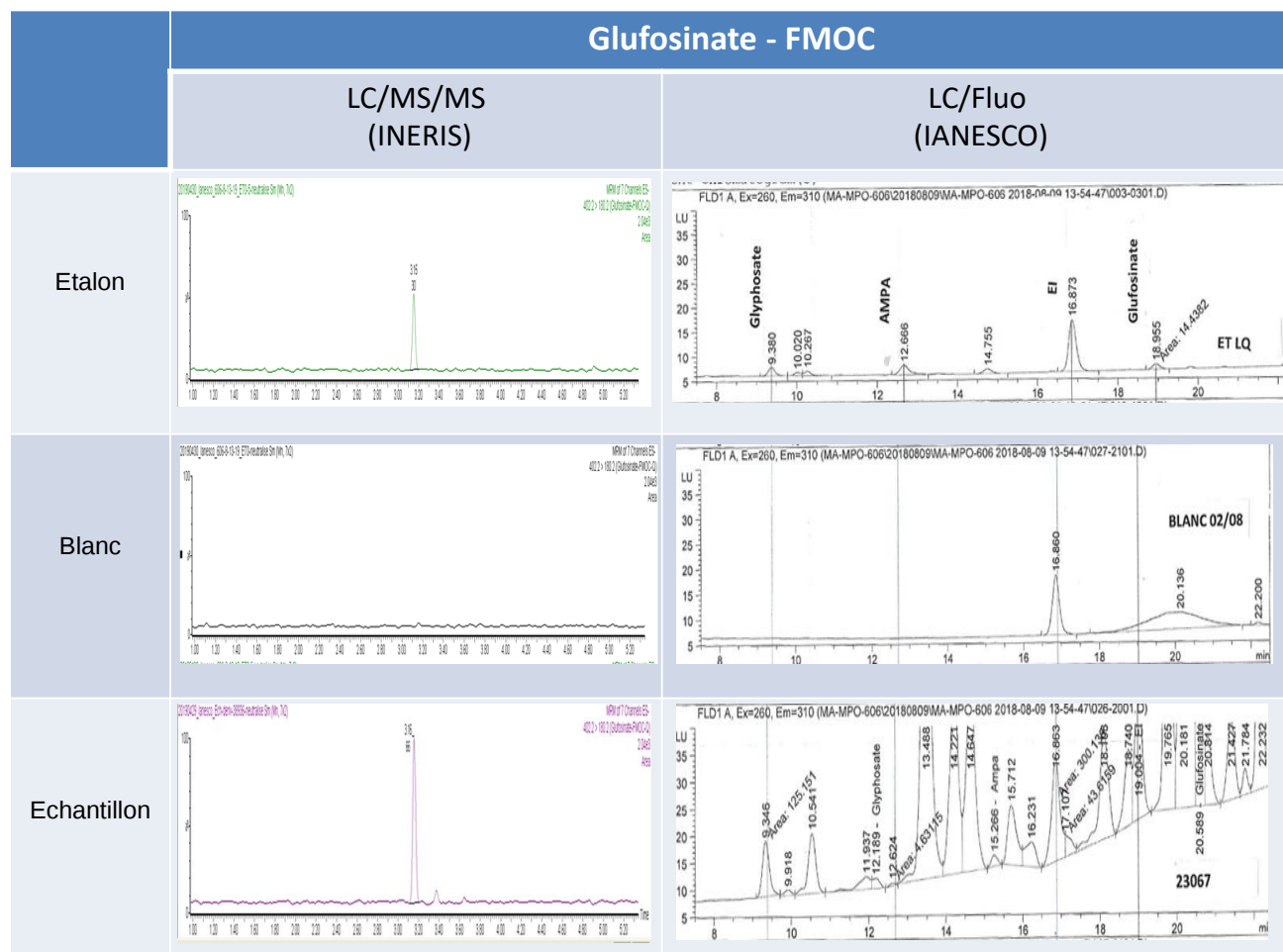


Figure 11 : Comparaison pour le glufosinate-FMOc des chromatogrammes obtenus par LC/MS/MS et LC/Fluo.

Les chromatogrammes obtenus sur l'échantillon et sur les étalons du laboratoire IANESCO ne montrent pas d'interférence sur la transition de quantification du glufosinate-FMOc selon la méthode d'analyse LC/MS/MS. L'utilisation de la spectrométrie de masse permet donc de s'affranchir du problème d'interférence observé en détection fluorimétrique et soulevé par le laboratoire. Compte tenu des rendements de dérivation observés, il est recommandé de réaliser l'étalonnage à partir d'une gamme extraite et dérivée.

5. CONCLUSION

La méthode développée en LC/MS/MS par le LCSQA-Ineris permet d'établir un domaine analytique s'étendant de 0,2 ng/mL à 200 ng/mL. Les modèles des fonctions d'étalonnage sont quadratiques de second degré sur l'ensemble du domaine de concentrations étudié.

La LQ analytique est estimée à 0,2 ng/mL mais, compte tenu de valeurs de blanc analytique de l'ordre de 0,5 ng/mL pour l'AMPA et le glyphosate, la LQ analytique de ces deux composés est augmentée à 2 ng/mL.

Les rendements de dérivation au FMOC-Cl sont satisfaisants pour l'AMPA et le glufosinate.

Une optimisation du protocole de dérivation serait nécessaire pour le glyphosate. Il est néanmoins possible de contourner cette difficulté soit en réalisant un étalonnage à partir d'une gamme extraite et dérivée, soit avec un étalonnage interne avec ajout de glyphosate marqué.

Les rendements d'extraction avec l'étape de dérivation au FMOC restent satisfaisants pour l'AMPA et le glufosinate, supérieurs à 80%, tandis que celui du glyphosate est de 61 %. L'extraction est efficace pour les trois composés car ces rendements correspondent aux rendements de dérivation.

Selon les performances de la méthode d'analyse établies (LQ obtenues en LC/MS/MS et rendements d'extraction et de dérivation), les limites de quantification pour chacun des 2 préleveurs habituellement utilisés par les AASQA (DA 80 et Partisol) sont estimées dans le tableau ci-dessous.

	LQ LC/MS/MS (ng/mL)	Rendement Extraction + Dérivation	LQ méthode (ng)	DA 80 LQ (ng/m ³)	Partisol LQ (ng/m ³)
Glyphosate	2	61 %	260	0,4 ⁽⁶⁾	1,5
AMPA	2	85 %	190	0,3	1,1
Glufosinate	0,2	84 %	19	0,03	0,11
Volume d'air prélevé				720 m ³	168 m ³
Durée du prélèvement				24h ou 48h	1 semaine

Tableau 7 : Limites de quantification estimées selon les préleveurs

Ces limites de quantification estimées n'ont pas fait l'objet d'une validation.

Les résultats de l'étude de stabilité sur filtre quartz montrent pour le glyphosate et le glufosinate une légère perte pendant les 15 premiers jours de stockage à 4°C, autour de 15%, puis une stabilisation jusqu'à la fin de l'étude à J60. Les résultats de l'AMPA montrent que ce composé est stable pendant les 60 jours de stockage à +4°C.

La stabilité de l'AMPA et du glyphosate dans les extraits a été démontrée sur une période de 35 jours.

⁶ Calcul : $2 \text{ ng/mL (LQ-LC/MS/MS)} \times [8 \text{ mL (volume d'extrait final)} / 5 \text{ mL (prise d'essai de l'extrait)}] \times 50 \text{ mL (volume de l'extrait)} / [\text{Rendement} \times 720 \text{ m}^3 \text{ (volume d'air prélevé)}]$.

6. GLOSSAIRE

ACN	Acétonitrile
AASQA	Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
DA 80	Préleveur haut volume
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EMQ	Eau Milli-Q
FMOC-Cl	(9-Fluorénylméthyl) chloroformate CAS : 28920-43-6
HCl	Acide chlorhydrique
LC	Chromatographie Liquide
LQ	Limite de Quantification
MRM	Multi reaction mode
MS	Spectrométrie de Masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en mode tandem
NaOH	Hydroxyde de sodium (soude)
Partisol	Préleveur bas volume
TEA	TriEthylAmine
TQD	Détecteur Triple Quadripôle
UPLC®	Chromatographie Liquide Ultra Performante (marque déposée WATERS)



direction et secrétariat du LCSQA

INERIS - parc technologique Alata - BP 2 - F60550 Verneuil-en-Halatte
tél. 03 44 55 64 04 - www.lcsqa.org